

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Р.Х. АЮПОВ, К.С. УСАЧЕВ

Выделение и очистка белка для исследования методом ЯМР

Учебно-методическое пособие

**Казань
2016**

УДК 577.29

ББК 28.072

*Печатается по решению
Учебно-методической комиссии Института физики
Казанского (Приволжского) федерального университета*

Научный редактор –

канд. биол. наук, проф. кафедры биохимии и биотехнологии Института
фундаментальной медицины и биологии М.М.Юсупов

Рецензент:

доктор хим. наук, проф., в.н.с. лаборатории магнитной томографии и
спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.
Ломоносова В.И. Польшаков

Авторы:

Р.Х. Аюпов, К.С. Усачев

Аюпов Р.Х.

**Выделение и очистка белка для исследования методом ЯМР
высокого разрешения / Р.Х. Аюпов., К.С. Усачев. – Казань: Казан. ун-
т, 2016. – 39 с.**

Учебно-методическое пособие для студентов-бакалавров специальностей «Медицинская физика» и «Биохимия» и магистров по специальностям «Медицинская физика», «Биохимия» и «Биоинформатика». Данное пособие является кратким руководством по планированию и проведению экспериментальной работы в области выделения и очистки белка для дальнейшего исследования методом ядерно-магнитного резонанса. В пособии кратко описывается методика ЯМР структурного анализа и требования к образцам для записи спектров, описывается ход подготовки белка на примере выделения и очистки белка SaHpf, клонированного в *E.coli*. Кратко описаны основные проблемы, возникающие в процессе проведения эксперимента, и рассмотрены пути их решения. Пособие предназначено для студентов бакалавриата и магистратуры, аспирантов, научных работников и преподавателей, специализирующихся в области структурной биологии и спектроскопии ЯМР, а также может быть рекомендовано для реализации индивидуальных траекторий обучения в Институте фундаментальной медицины и биологии, Институте физики и Химическом институте.

© Аюпов Р.Х. 2016

© Усачев К.С. 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ВВЕДЕНИЕ В МЕТОДИКУ ЯМР СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА.....	6
2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ЯМР.....	12
3. ПОДГОТОВКА МИНИМАЛЬНОЙ СИНТЕТИЧЕСКОЙ СРЕДЫ.....	13
4. РАСТВОРЫ БУФЕРОВ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ БЕЛКА.....	15
5. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА.....	17
5.1. Измерение плотности культуры.....	18
6. ХОД ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БЕЛКА.....	19
7. ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯ БЕЛКОВ.....	24
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	32
Приложение 1.....	32
Приложение 2.....	35

ВВЕДЕНИЕ

Структурная биология это раздел молекулярной биологии, биохимии и биофизики, занимающийся изучением структуры биологических макромолекул, в частности белков и нуклеиновых кислот. Развитие современных физических методов изучения трехмерной структуры молекул, таких, как рентгеноструктурный анализ, криоэлектронная микроскопия и ядерный магнитный резонанс, позволило подойти к пониманию механизмов, протекающих в живых системах на молекулярном уровне. Одним из наиболее наглядных примеров прорыва науки последнего времени в этой области является создание антибиотиков, действующих против рибосом и белоксинтезирующего аппарата клеток. В течение последнего десятилетия с помощью анализа структур рибосом из грамотрицательных бактерий и их комплексов с различными антибиотиками были установлены их механизмы действия и показаны возможные пути бактериальной резистентности.

В настоящее время наиболее широко применяются три экспериментальных метода определения пространственной структуры биомолекул. Исторически первым и наиболее распространённым методом является рентгеноструктурный анализ (РСА) кристаллов биологических молекул, с помощью которого в 1962 г. были сделаны два выдающихся открытия прошлого века, определившие пути развития наук о жизни - установление трехмерной структуры ДНК (Дж. Уотсон, Ф. Крик М. Уилкинс, Нобелевская премия по физиологии и медицине 1962 года) и белка миоглобина, ответственного за депонирование и транспорт кислорода в мышцах (М. Перутц и Дж. Кендрию, Нобелевская премия по химии 1962 года). Остальными двумя методами структурных исследований являются криоэлектронная микроскопия замороженных макромолекулярных комплексов и спектроскопия ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) биомолекул в растворе и твердом теле. За

разработку ЯМР методов установления трехмерной структуры белка К. Вютрих в 2002 году также был удостоен Нобелевской премии по химии. Также широко применяются расчетные методы предсказания структуры молекул с помощью современных информационных технологий (биоинформатика). У каждого из данных подходов есть свои области применения и ограничения.

Экспериментальные методы определения пространственной структуры позволяют получать информацию о трехмерном строении молекулы в нативном состоянии - «так как она есть» в кристаллической или жидкой фазе, учитывая ее особенности, будь то подвижность определенных доменов молекулы или ее различные конформации. Одним из наиболее важных этапов для экспериментальных методов является получение образца (его выделение, очистка и иные молекулярные манипулирования) и подбор условий эксперимента. В методе РСА – это подбор условий для роста дифрагирующего кристалла, в случае ЯМР – условий, при которых количество и качество спектральной информации будет достаточно для дальнейшей реконструкции трехмерной модели белка (чистота образца, его растворимость, стабильность по температуре или подбор условий для роста клеток в среде с обогащенными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N).

В данном пособии подробно рассмотрены этапы выделения белка с мечеными изотопами по ядрам ^{15}N и/или ^{13}C в системе *E.coli* для ЯМР исследований на примере специфического белка SaHPF, инактивирующего рибосомы бактерии *Staphylococcus aureus*. Этот белок состоит из 190 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 22,22 кДа. Рассмотрены также основные этапы приготовления образца: подбор питательной среды, состава буферов и других особенностей для выделения и очистки белка для структурных исследований методом ЯМР высокого разрешения [1].

1. ВВЕДЕНИЕ В МЕТОДИКУ ЯМР СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

ЯМР - резонансное поглощение электромагнитных волн, обусловленное квантовыми переходами атомных ядер между энергетическими состояниями с разными ориентациями спина (магнитного момента) ядра (Ядерный магнитный резонанс // Большой энциклопедический словарь. URL:

<http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc3p/340582/%D0%AF%D0%94%D0%95%D0%A0%D0%9D%D0%AB%D0%99> дата обращения (03.03.2016)).

Характеристики наиболее важных ядер для биомедицинских исследований приведены в таблице 1. Преимуществом ЯМР является то обстоятельство, что метод позволяет получать информацию о структуре и динамике молекул в растворе (в таком состоянии они находятся в живом организме) - что принципиально важно для исследований биологических молекул. Естественно, используется и ЯМР спектроскопия вещества в кристаллическом или поликристаллическом состоянии. Но только для определенного круга задач, поскольку чувствительность метода невысока.

Таблица 1.

Характеристики некоторых биологически важных ядер

Ядро	Спин	Резон. частота МГц	Гиромагнитное отношение (10^7 радиан $s^{-1} T^{-1}$)	Относит. чувствительность	Природное содержание %	Абсолютн. чувствительность
1H	$\frac{1}{2}$	600	26,7522	100,00	99,98	100,0000
^{13}C	$\frac{1}{2}$	150	6,7283	1,59	1,11	0,0176
^{15}N	$\frac{1}{2}$	60	-2,7126	0,10	0,37	0,0004
^{17}O	$\frac{5}{2}$	81	-3,6280	2,91	0,04	0,0011
^{19}F	$\frac{1}{2}$	564	25,1815	83,00	100,00	83,0000
^{23}Na	$\frac{3}{2}$	159	7,0704	9,25	100,00	9,2500
^{31}P	$\frac{1}{2}$	243	10,8394	6,63	100,00	6,6300
^{77}Se	$\frac{1}{2}$	114	5,1214	0,69	7,58	0,0525

Метод ЯМР широко применяется в биологии и медицине в таких областях как изучение строения и свойств низкомолекулярных биологически активных соединений; определение структуры биомакромолекул (белки, нуклеиновые кислоты, углеводы); изучение динамических свойств биомолекул; установление белок-лигандных взаимодействий (*ЯМР-скрининг* биологически активных соединений); изучение строения и свойств биологических мембран; анализ состава биологических жидкостей (*метабономика*); визуализация биологических объектов (*ЯМР-томография*); мониторинг процессов, происходящих в живом организме (*in-cell ЯМР, in-vivo спектроскопия*); исследование функциональной активности мозга (*f-MRI*). Метод спектроскопии ЯМР характеризуется большим числом параметров. К ним относятся *химические сдвиги*, на основе которых производится отнесение сигналов в спектрах и получают информацию о вторичной структуре белка; *интегральные интенсивности сигналов*, которые позволяют определять количество измеряемого компонента; *скорости обмена протонов на дейтерий*, что дает информацию о положении водородных связей, сворачивании и разворачивании молекулы белка и нуклеиновых кислот; *константы спин-спинового взаимодействия* (через химическую связь), дающие характеристики химических связей, двугранных углов и водородных связей; *ядерные эффекты Оверхаузера* (взаимодействие через пространство), на основе которых напрямую определяются расстояния между магнитными ядрами, отстоящие друг от друга на расстоянии до 5 Å, а также определяются динамические и кинетические характеристики; *ширины спектральных линий, времена, релаксации ядер и кросс-релаксации*, несущие информацию о динамике молекулы и конформационных переходов в молекуле; *константы диполь-дипольного взаимодействия*, анализ которых дает информацию о динамических эффектах и ориентации белковых доменов и биологических молекул в целом.

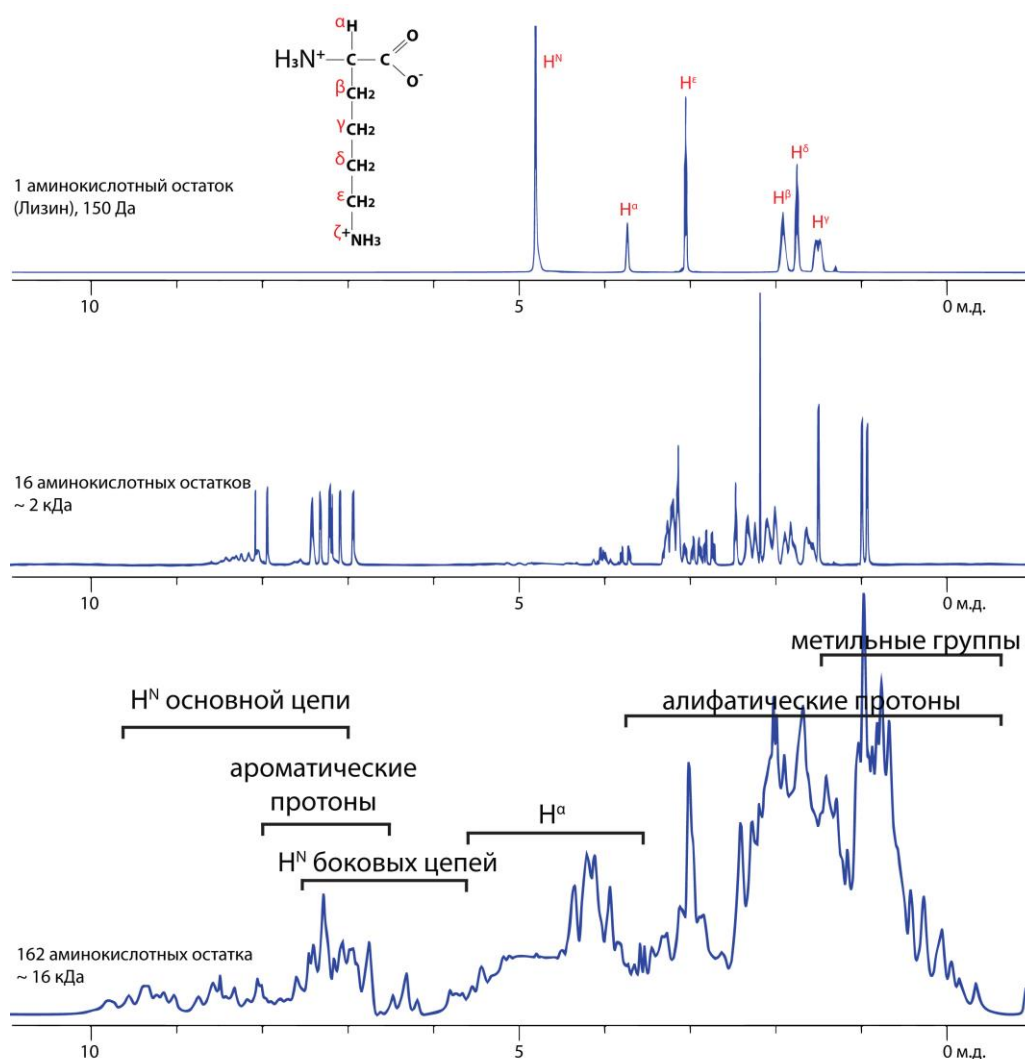


Рис. 1. Примеры спектров ЯМР 1H белков

Первоначальным этапом установления структуры методом ЯМР высокого разрешения является отнесение всех сигналов в одномерных спектрах к соответствующим магнитным ядрам (1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P и др.). Однако с увеличением молекулярной массы, а значит и количества ядер, входящих в состав молекулы, спектры ЯМР существенно усложняются за счет перекрывания сигналов (Рис. 1). Для решения данной проблемы был разработан метод последовательного отнесения сигналов на основе двумерных методик ЯМР, позволяющих разнести перекрывающиеся сигналы по двум измерениям (1H - 1H COSY, 1H - 1H TOCSY, 1H - 1H NOESY, 1H - ^{13}C HSQC, 1H - ^{15}N HSQC и др.). Применение данного метода схематически приведено на рисунке 2.

Метод последовательного отнесения

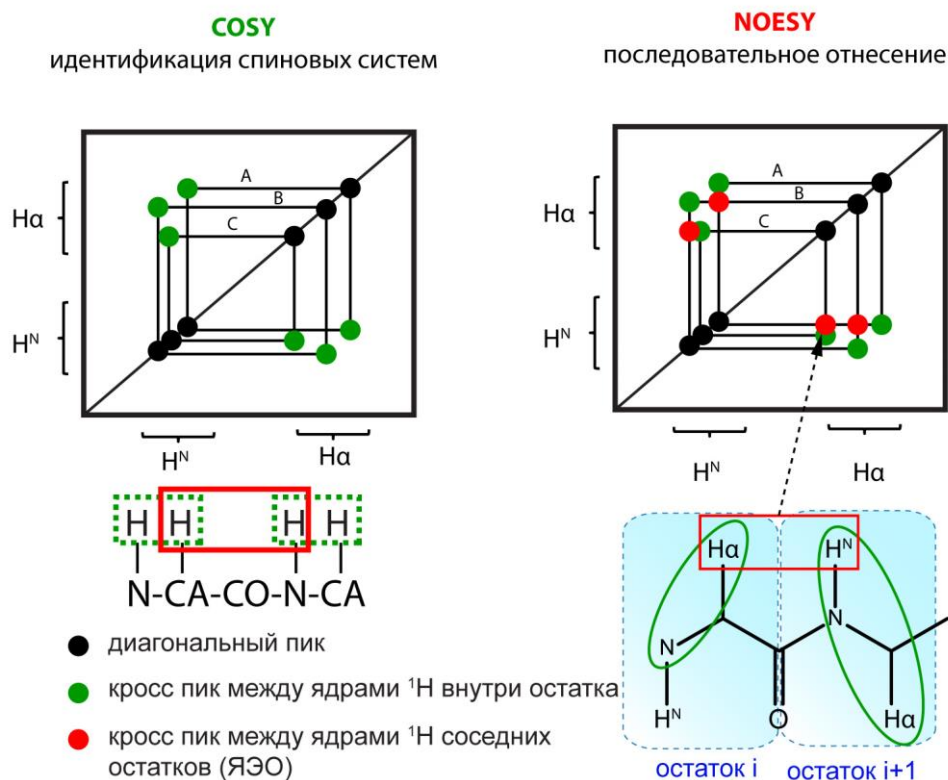


Рис. 2. Метод последовательного отнесения сигналов в спектрах ЯМР белков

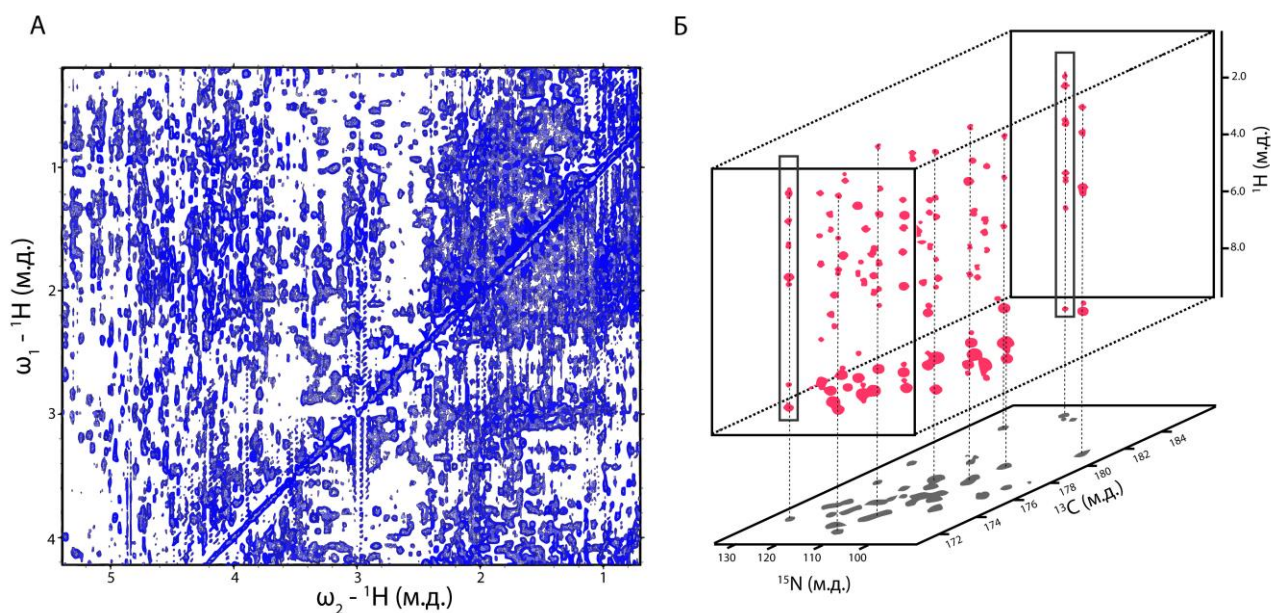


Рис. 3. Фрагменты спектров ЯМР: а) двумерный спектр ^1H - ^1H NOESY для белка с массой 18 кДа; б) трёхмерный ^1H - ^{13}C - ^{15}N спектр ЯМР

Данный метод эффективен при установлении структуры молекул с молекулярной массой примерно до 10 кДа. При дальнейшем увеличении молекулярной массы происходит перекрывание сигналов и в двумерных спектрах. В качестве примера на рисунке 3а приведен фрагмент двумерного спектра ^1H - ^1H NOESY для белка с молекулярной массой 18 кДа.

Для решения этой проблемы в 70-х годах XX века В.Ф. Быстровом, а позднее Л. Мюллером, Р. Эрнстом и Э. Баксом были разработаны методы трехмерной спектроскопии ЯМР, в которых намагниченность последовательно переносится с одних ядер на другие (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) [2-5]. Как видно из таблицы 1, природное содержание (относительная распространенность) атомов с изотопами ^{13}C со спином $\frac{1}{2}$ составляет 1,11 % от числа всех атомов углерода в молекуле, а атомов с изотопами ^{15}N еще меньше - 0,37 %. Изотопы это разновидность атомов одного и того же химического элемента, атомные ядра которых имеют одинаковое число протонов и различное число нейтронов и занимают одно и то же место в периодической системе химических элементов Менделеева (Изотопы // Физическая энциклопедия. В 5-ти томах. URL: http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_physics/1072 (дата обращения 03.03.2016)).

По этой причине были созданы специальные методики обогащения (мечения) атомов основной и боковых цепей молекулы изотопами углерода ^{13}C и азота ^{15}N . Основная идея этих методик заключается в замене стандартной среды для роста клеток на так называемую «бедную» или «минимальную синтетическую» среду, состоящую из глюкозы- ^{13}C (шесть атомов углерода в кольце заменены на изотопы ^{13}C) и соли аммония $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Следует отметить, что соединения с мечеными изотопами довольно дорогостоящие, а питательная среда на их основе содержит в несколько раз меньше молекул, чем обычная, что уменьшает количество элементов, из которых происходит сборка молекул белка. Это приводит к резкому

снижению роста клеток в таких средах. Тем не менее, благодаря такой замене, экспрессия белков в клеточной системе происходит таким образом, что во время синтеза молекулы белка атомы углерода имеют изотоп ^{13}C , а азота ^{15}N , что позволяет добиться выигрыша в чувствительности ЯМР экспериментов в несколько раз. По этой причине принципиально важно, чтобы замещение атомов на изотопы со спином $\frac{1}{2}$ составляло 100 %, так как в противном случае в трехмерных спектрах будут наблюдаться разрывы в цепочке корреляций между атомами.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ЯМР

Итак, сформулируем следующие требования к образцу белка для спектроскопии ЯМР:

- **Молекулярная масса.** Для белков с молекулярной массой до ~10 кДа обогащения не требуется. Для белков с молекулярной массой 5-15 кДа необходимо обогащение по ядрам ^{15}N . Для белков с молекулярной массой 10–25 кДа необходимо обогащение по ядрам ^{15}N и ^{13}C . Для белков с молекулярной массой 20-45 кДа необходимо обогащение по ядрам ^{15}N , ^{13}C , ^2H и использование ЯМР спектрометров с сильными магнитными полями (рабочие частоты 800 МГц и выше, применение специальных криодатчиков ЯМР с большей чувствительностью). Для белков с молекулярной массой 35-55 кДа необходимы специальные методики мечения ядрами ^{15}N , ^{13}C , ^2H и использование ЯМР спектрометров с высокопольными магнитами (рабочие частоты 800 МГц и выше, применение специальных криодатчиков ЯМР с большей чувствительностью);
- **Достаточная растворимость белка** (концентрация ~ 1 мМ, т.е. от 20 мг/мл для белка с массой 20 кДа); и **достаточное количество белка в ампуле** (~ 5-8 мг для одного образца белка с весом 20 кДа);
- **Стабильность** белка в течение нескольких дней при температурах 10-30 °С;
- **Высокая чистота и отсутствие агрегации;**
- **Высокий уровень экспрессии белка.**

В данном пособии на примере белка SaHPF с молекулярной массой 22,22 кДа описаны процессы планирования экспериментальной работы, культивирования клеток, выделения и очистки белка. Данный белок SaHPF был клонирован в вектор pGS21A с tag 6-His на С конце. Вектор был трансформирован в клетки *E.coli* типа BL21star(DE3).

3. ПОДГОТОВКА МИНИМАЛЬНОЙ СИНТЕТИЧЕСКОЙ СРЕДЫ

Минимальные синтетические среды (далее по тексту M9) – это среды, в составе которых минимум питательных элементов (Минимальная синтетическая среда // SubtiWiki. URL: http://subtiwiki.uni-goettingen.de/wiki/index.php/M9_minimal_medium (дата обращения 03.03.2016); Минимальная синтетическая среда // Cold Spring Harbor Protocols. URL: http://cshprotocols.cshlp.org/content/2010/8/pdb.rec12295.full?text_only=true) (дата обращения 03.03.2016)). Ниже представлен один из возможных вариантов состава данной среды (список реактивов представлен в Приложение 2 в конце пособия).

1 литр среды M9 содержит следующие компоненты:

✓ Глюкоза - ¹³ C (добавлять непосредственно перед началом использование среды)	2 г на 1 л
✓ MgSO ₄ 1 М (автоклавирован)	1 мл
✓ CaCl ₂ 1 М (автоклавирован)	0,3 мл
✓ D-biotine 10 мг/мл (хранить при 4°C)	0,1 мл
✓ Thiamin 10 мг/мл (хранить при 4°C)	0,1 мл
✓ M9 Trace elements solutions ^x 100 (хранить на -20°C)	10 мл
✓ M9 Salt ^x 10 (в составе есть ¹⁵ NH ₄ Cl) (автоклавирован)	100 мл
✓ Антибиотик (amp) 100 мг/мл (хранить на -20°C)	1 мл
✓ mQ	доводим до 1 л

M9 Trace elements solutions ^x100 – это раствор, представляющий собой комплекс различных солей и одной кислоты, которые в небольших количествах необходимы для нормальной

жизнедеятельности клеток. Стоковый раствор на 1 литр содержит следующие компоненты:

✓ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka Chemika, 350629/1 20497, 250 г)	167 мг
✓ $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma, 53H0619, 100 г)	833 мг
✓ $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Prolabo, R.P. Normapur, 23 093.233, 250 г)	13 мг
✓ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma, 88H3445, 100 г)	10 мг
✓ H_3BO_3 (Euromedex, 50765, 1 кг)	10 мг
✓ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MERCK, A761363, 100 г)	1,149 г
✓ mQ.	доводим до 1 л

M9 Salt $\times 10$ (1000 мл) – это комплекс солей, которые необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток, в данный раствор так же входит $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Стоковый раствор на 1 литр содержит следующие компоненты:

✓ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 71650-1 кг)	154,3 г
✓ KH_2PO_4 (AnalaR Normapur, 26936.293-1 кг)	30 г
✓ NaCl (Carlo Erba, 479687-1 кг)	5 г
✓ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Cambridge Isotope Laboratories, I-15798H, 10 г)	5 г
✓ Доводим pH до 7,6	NaOH (10 M)
✓ mQ.	доводим до 1 л

4. РАСТВОРЫ БУФЕРОВ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ БЕЛКА

Одной из особенностей при работе с образцами для исследования методом ЯМР, является необходимость учитывать отсутствие компонентов, способных внести помехи или перекрыть спектры самого образца. Наиболее популярным буфером, используемым в образцах для ЯМР, является фосфатный буфер. Однако у данного буфера есть и свои отрицательные стороны - у него низкий диапазон значений pH (Буферные системы // sigma-aldrich. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html> (дата обращения 03.03.2016); Буферные системы // Cold Spring Harbor Protocols. URL: http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8303.full?text_only=true (дата обращения 03.03.2016)). Поэтому чаще в ходе процесса выделения и очистки белка используют другие буферные системы, а потом, на последней стадии очистки меняют используемый буфер на фосфатный (в процессе диализа или в ходе гель-фильтрации). Другая альтернатива - использование дейтерированных буферных растворов.

В данной работе использовали следующие буферы (хранить необходимо при 4°C):

- Cell Resuspension Buffer – T₂₀N₅₀₀ (1000 мл)
 - ✓ 1M Tris-HCl pH 7,6 20 мл
 - ✓ 4M NH₄Cl 125 мл

- Wash Buffer “A” – High Salt – T₂₀N₁₀₀₀ (500 мл)
 - ✓ 1M Tris-HCl pH 7,6 10 мл
 - ✓ 4M NH₄Cl 125 мл

- Wash Buffer “B” – Low Imidazole – T₂₀N₅₀₀I₂₀ (500 мл)
 - ✓ 1M Tris-HCl pH 7,6 10 мл
 - ✓ 4M NH₄Cl 62,5 мл
 - ✓ Imidazole 0,68 г
 - ✓ Доводим pH до 7,6 HCl (37 %)

- Elution Buffer – T₂₀N₅₀₀I₃₀₀ (мл)
 - ✓ 1M Tris-HCl pH 7,6 20 мл
 - ✓ 4M NH₄Cl 125 мл
 - ✓ Imidazole 20,42 г
 - ✓ Доводим pH до 7,6 HCl (37 %)

- Running Buffer – Ph₅₀N₂₅₀ (2000 мл)
 - ✓ 1M Phosphate buffer pH 6.8 100 мл
 - ✓ 4M NH₄Cl 125 мл

5. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА

На первом этапе работы необходимо посеять клетки на чашки с твердой средой LB, добавив ампициллин до концентрации 100 мкг/мл. Чаше, клетки на чашку сеют вечером и оставляют расти колонии в течение ночи при 37°C. На следующее утро, при наличии видимых колоний, чашку убирают на комнатную температуру и оставляют ее на 3-4 часа, а потом помещают в холодильник (на 4°C).

Как правило, вечером с чашки берут одну колонию и переносят в среду LB для использования в качестве прекультуры, в которую предварительно добавляют ампициллин (на 100 мл среды 100 мкл ампициллина из стокового раствора 100 мг/мл). Однако, так как клеткам предстоит расти в обеднённой среде, то для более комфортного планирования работы, необходимо посеять клетки в среду M9 днем. Рост клеток до плотности OD₆₀₀, равной 2 единицам и выше, будет длиться в течение 25-30 часов. Экспериментально наблюдали 25, 28, 30 часов роста клеток в среде M9 до нужной плотности. Большое значение имеет, сколько клеток внесли в будущую прекультуру из чашки, но, так как в идеале надо брать клетки из одной колонии, то лучше дать возможность клеткам дольше расти, чем переносить в среду клетки из разных колоний. После достижения в прекультуре определенной (2 единицы и выше) плотности клеток, некоторое количество прекультуры добавляют в культуру (среда, объем которой позволит нарастить достаточное количество клеток для дальнейших манипуляций). Количество добавляемой прекультуры прямо зависит от ее плотности, и в конечном итоге необходимо довести плотность культуры до OD₆₀₀ равной 0,1. Дальнейший рост культуры происходит до плотности среды, равной OD₆₀₀:0,6 (~ 4-6 часов). После достижения данной плотности запускается экспрессия белка с помощью IPTG (до 1 мМ в растворе). Экспрессия белка происходит в течение более 20 часов.

5.1. Измерение плотности культуры

В данной работе использовали спектрофотометр Eppendorf BioPhotometer 8.5 мм. Данный спектрофотометр имеет диапазон измерения плотности от 0,2 до 1, рекомендуемый диапазон от 0,5 до 0,7 единиц поглощения. При измерении плотности культуральной среды, рекомендуется развести ее до указанных значений (если показатели выше предела) и после, при расчете, умножить на коэффициент разведения. При измерении плотности необходимо выставить прибор на «0», проводя измерение на чистой среде, не содержащей клеток, для этого при приготовлении среды до внесения клеток несколько мл чистой среды отбираются в отдельные аликвоты. Надо учитывать, что отобранные аликвоты должны храниться в закрытых пробирках типа Эппендорф во избежание контаминации («зарастания» среды).

График роста клеток по данным плотности культуры в 1 литре среды (в среде M9, с изотопом ^{15}N) представлен на рисунке 4:

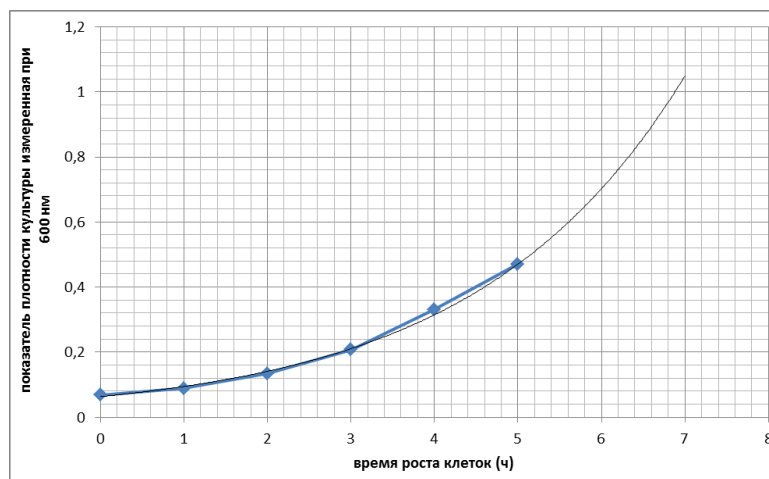


Рис. 4. Кривая роста клеток

Синяя линия — экспериментальные данные плотности среды, серая линия — аппроксимация экспериментальных данных экспоненциальной кривой, показывающая динамику роста клеток во времени. По X — время в часах, по Y — показатель плотности при OD₆₀₀.

6. ХОД ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БЕЛКА

I. Рост культуры клеток *E. coli* типа BL21Star(DE3) содержащих плазмиду pGS21A с вставкой SaHPF (BL21Star(DE3)/pGS21A-SaHPF)

1. Инкубирование прекультуры из одной колонии клеток *E. coli* (BL21Star(DE3)/pGS21A-SaHPF) при 37°C в течение всей ночи, при перемешивании (≈ 200 rpm) в 100 мл среды M9 содержащей 100 мкг/мл ампициллина (!)
2. Инкубирование культуры со средой M9 содержащей 100 мкг/мл ампициллина с прекультурой ($OD_{600}=0,1-0,2$ в культуре) при 37°C при перемешивании (180 rpm) в течение 5-7 часов до $OD_{600} = 0,5-0,6$.
3. Индуцирование экспрессии белка **SaHPF** с добавлением раствора 1 М IPTG (по 0,5 мл на литр) до финальной концентрации 0,5 мМ при 37°C при перемешивании (180 rpm) в течение минимум 20 часов.
4. Осаждаем клетки *E. coli* с помощью центрифугирования при 6000 rpm в течение 10 мин при 4°C в роторе “JLA 8.100” на центрифуге BECKMAN COULTER.
5. Осажденные клетки *E.coli* промываем в “cell resuspension buffer” и переносим в посуду для хранения (фальконы на 50 мл), центрифугируем, выливаем супернатант и оставляем осадок.
6. Осажденные клетки храним при - 20°C.

II. Выделение белка SaHPF из клеток *E. coli* BL21Star(DE3)/pGS21A-SaHPF

7. Растворяем 5 г размороженных клеток *E. coli* (BL21Star(DE3)/pGS21A-SaHPF) в 10 мл в “cell resuspension buffer”.
8. В раствор клеток добавляем 0,4 мл Complete Protease Inhibitor, 30 мкл DNase RNase-Free, 60 мкл PMSF. Суспендируем клетки до гомогенного состояния. Все манипуляции выполняются на льду.
9. Лизируем клетки под давлением – 1,2 килобар на Constant Cell Disruption System. Лизированные клетки пропускаем под давлением 3 раза.
10. Переносим клеточный лизат (в ходе манипуляций на предыдущем этапе ≈ 70 мл) в две чистые роторные тубы “УА 25.50” объемом по 30 мл.
11. Осаждаем клеточный дебрис с помощью центрифугирования при 25000 г в течение 30 минут на роторе “УА 25.50” при 4°C на центрифуге BECKMAN Avanti J-25. Аккуратно отбираем супернатант и перемещаем в роторные тубы “Ti 50.2”, в две по ≈ 25 мл. Тубы должны быть заполнены на 90 %.
12. Повторяем центрифугирование для осаждения крупных молекулярных комплексов (н-р: рибосом) на ультрацентрифуге BECKMAN COULTER при 45000 rpm в течение 45 мин. на роторе “Ti 50.2” при 4°C. Аккуратно отбираем супернатант без примеси осадка! Далее работаем с супернатантом.

III. Очистка белка SaHPF связанного с гистидиновым тагом на заполняемой колонке со смолой Ni-NTA Superflow (QIAGEN), объем смолы 4 мл (Смола QIAGEN // QIAGEN. URL: <https://www.qiagen.com/fr/shop/sample-technologies/protein/protein-preparation/ni-nta-superflow#technicalspecification> (дата обращения 03.03.2016))

1. Заполняем колонку смолой Ni-NTA Superflow. Уравновешиваем колонку – промываем колонку от спирта с помощью “cell resuspension buffer”, 5 кратным объемом – то есть $4 \times 5 = 20$ мл.
2. Вносим супернатант в колонку.
3. Отмываем смолу от неспецифического связывания:
 - 40 мл (10 кратный объем) Wash Buffer “A” – High Salt – $T_{20}N_{1000}$
 - 40 мл (10 кратный объем) Wash Buffer “B” – Low Imidazole – $T_{20}N_{500}I_{20}$
4. Элюируем гистидин-связанный белок с помощью Elution Buffer – $T_{20}N_{500}I_{300}$:
 - вносим 12 мл Elution Buffer, даем раствору проникнуть в смолу (≈ 2 мл), закрываем колонку с обеих сторон, инкубируем в течение 15 минут
 - открываем колонку, собираем фракции по 0,5 мл, через 4 мл, снова инкубируем 15 минут, собираем фракции по 0,5 мл.
5. Промываем колонку 20 мл “cell resuspension buffer” и 10 мл спирта, храним в спирте.

IV. Осаждение белка в растворе

6. К 1 мл раствора белка SaHPF (фракции после элюирования) добавляем 0,45 г соли аммония сульфата (Осаждение белка солью // Encor Biotechnology. URL: <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.html> (дата обращения 03.03.2016)).
7. Перемешиваем при 4°C в течение часа (можно оставить на ночь перемешиваться).
8. Осаждаем осадок в растворе белка с аммония сульфатом при помощи центрифугирования при 20000 г в течение 30 мин при 4°C на центрифуге BECKMAN COULTER Microfuge R.
9. Выливаем супернатант, работаем с осадком.
10. Растворяем осадок в 0,5 мл “cell resuspension buffer”.
11. Осаждаем не растворимые фракции при помощи центрифугирования при 20000 г в течение 30 мин при 4°C на центрифуге BECKMAN COULTER Microfuge R.
12. Отбираем супернатант, дальше работаем с ним.
13. Фильтруем раствор белка на фильтрах Millipore 0,22 мкм.
14. Измеряем концентрация белка в полученном растворе на спектрофотометре NanoDrop.
15. Концентрация белка:
 - ✓ SaHPF массовая концентрация: $xx A_{280}/мл / 0,537 = \underline{yy \text{ мг/мл}}$
 - ✓ SaHPF молярная концентрация: $xx A_{280}/мл / 0,01192 = \underline{zz \text{ мкМ}}$

V. Конечная стадия очистки белка SaHPF на гель-фильтрационной колонке Superdex 75 10/300

16. Уравновешиваем колонку в буфере Running Buffer – Ph₅₀N₂₅₀. Скорость промывки колонки устанавливаем 0,4 мл/мин, предел давление 1,5 МПа.
17. Вносим 0,5 мл раствора белка на колонку через петлю с помощью шприца:
 - в 0,5 мл – 6,2 г белка
18. Элюируем колонку по следующему протоколу: промываем петлю 1,5 мл и элюируем со скоростью 0,4 мл/мин, предел давления 1,5 МПа. Собираем фракции по 250 мкл.
19. Измеряем итоговую концентрацию белка:
 - ✓ SaHPF массовая концентрация: $xx A_{280}/\text{мл} / 0,537 = \underline{yy \text{ мг/мл}}$
 - ✓ SaHPF молярная концентрация: $xx A_{280}/\text{мл} / 0,01192 = \underline{zz \text{ мкМ}}$

Полученный образец собирают в аликвоты, объем и концентрация которого зависят от поставленных условий для ЯМР эксперимента. При необходимости фракции после гель-фильтрации концентрируют до требуемых значений с помощью концентраторов с определенными параметрами фильтра. Далее необходимо провести стадию диализа. Образец помещается в диализный мешочек или кассету и проводится 2 стадии диализа в магнитной мешалке при температуре +4°C течение 12 часов в 1 литре раствора содержащего 100 mM KCl, ~20 mM фосфата натрия при pH~6. В указанный раствор добавляют азид натрия (яд, индекс риска (R28-32-50/53), внимательно ознакомиться с инструкцией перед работой (Паспорт безопасности азиды натрия // BioRad. URL: http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/WWMSDS/CSD/RUS/RUS_RUS_425-1237.pdf (дата обращения 03.03.2016)). Данный компонент препятствует разложению образца бактериями, что важно для длительных ЯМР экспериментов. Концентрацию азиды натрия доводят до 0,1 %, например: к 150 мкл образца добавляют 1,5 мкл стокового 10 % раствора азиды натрия.

7. ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯ БЕЛКОВ

На первом этапе работы с белками методами ЯМР спектроскопии высокого разрешения анализируются одномерные спектры ^1H образца, не обогащенного изотопами (рис. 1). На этом этапе делаются выводы о стабильности образца (анализ изменений в спектре с течением времени) при различных температурах и времени жизни образца. Наиболее благоприятными считаются образцы со временем жизни более одной недели, так как это позволяет провести серию экспериментов при одинаковых условиях.

После подбора оптимальных условий эксперимента ЯМР переходят к образцам, меченным по ядрам азота ^{15}N . Из анализа дисперсии сигналов в спектрах ^1H - ^{15}N HSQC (гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия) делаются выводы об упорядоченности белка, т.е. о наличии участков с вторичной структурой. Наличие участков со вторичной структурой в виде спиралей или β -складок приводит к тому, что химические сдвиги сигналов атомов этих участков сильно отличаются от неупорядоченных частей белка за счет характерных различий в химическом окружении. В идеале количество кросс пиков от амидных (NH) групп в спектре ^1H - ^{15}N HSQC должно совпадать с количеством аминокислотных остатков в последовательности белка. Если сигналов больше, чем количество NH групп (например вдвое), то это указывает на наличие нескольких конформеров молекулы, одновременно существующих в растворе. Если количество наблюдаемых сигналов меньше, это указывает на наличие в структуре белка подвижных участков, например, доменов, участвующих в процессе фолдинга/рефолдинга. В этом случае подбираются условия для стабилизации структуры (анализируется влияние pH буфера, концентрации солей, эффекты при добавлении различных детергентов, влияние температуры). На рисунке 5

приведен пример двумерного спектра ^1H - ^{15}N HSQC для N-домена белка SaHPF в 50 мМ растворе RE (Arg+Glu) буфера.

После того, как все условия подобраны, переходят к подготовке и анализу образца белка, обогащенного изотопами ^{13}C и ^{15}N и регистрации трехмерных спектров. На основе полученных спектров (от 5-6 экспериментов, продолжительность каждого ~ 1 день), производится отнесение сигналов, и получают таблицу химических сдвигов ядер, т.е. информацию о резонансной частоте каждого ядра.

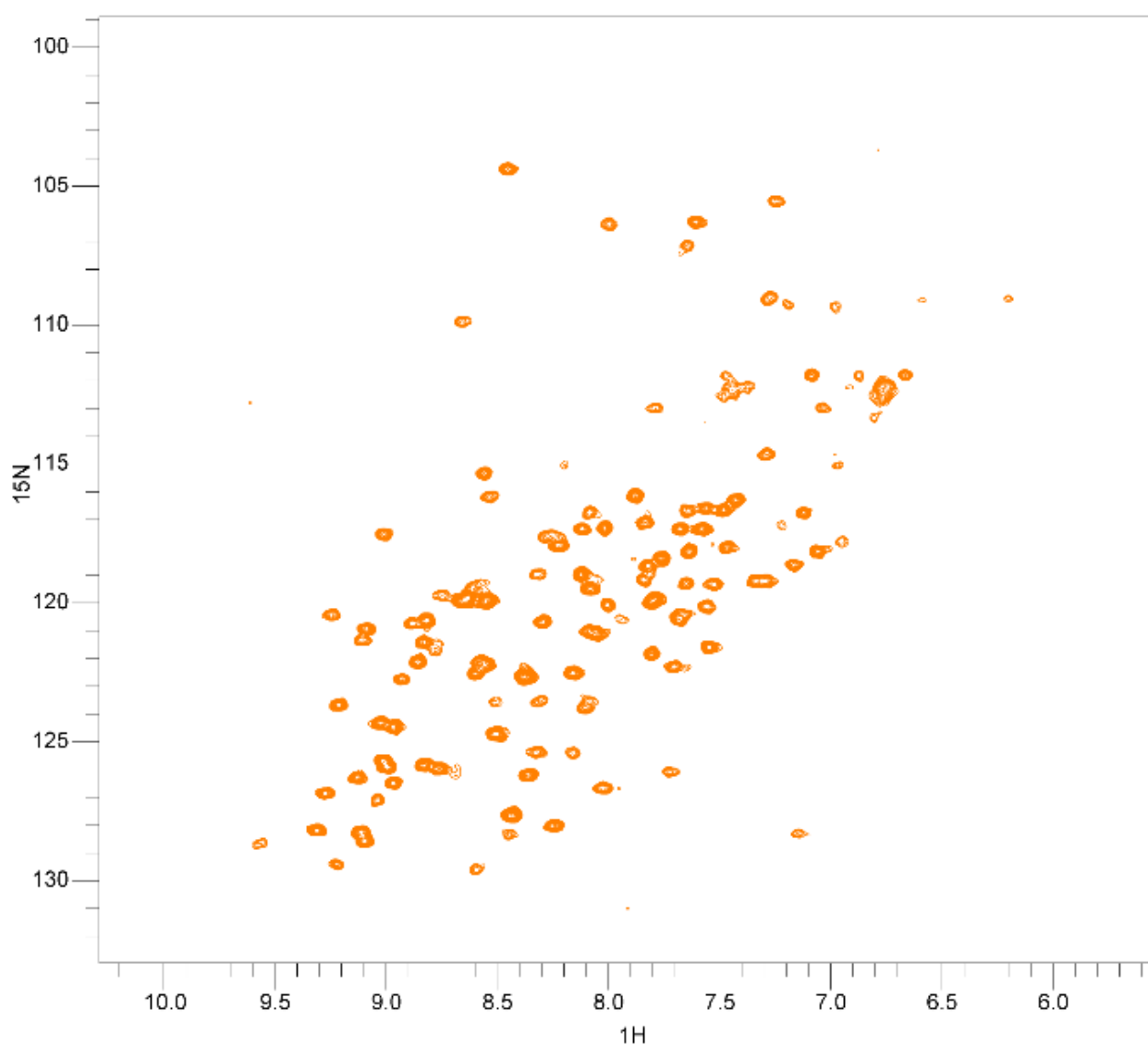


Рис. 5. ^1H - ^{15}N HSQC спектр N-домена белка SaHPF в 50 мМ растворе RE (Arg+Glu) буфера (90% H_2O + 10% D_2O)

Основные 3D эксперименты для отнесения сигналов в спектрах ЯМР белков:

- HNCA
- HNCO
- HN(CO)CA
- HN(CA)CO
- CBCANNH
- CBCA(CO)NNH
- (H)CC(CO)NH
- HCCH TOCSY
- HCCH NOESY

На рисунке 6 приведен пример отнесения сигналов белка на основе экспериментов CBCANH и CBCA(CO)NH, на рисунке 7 на основе экспериментов HNCA, HN(CA)CO, HNCO и HN(CO)CA.

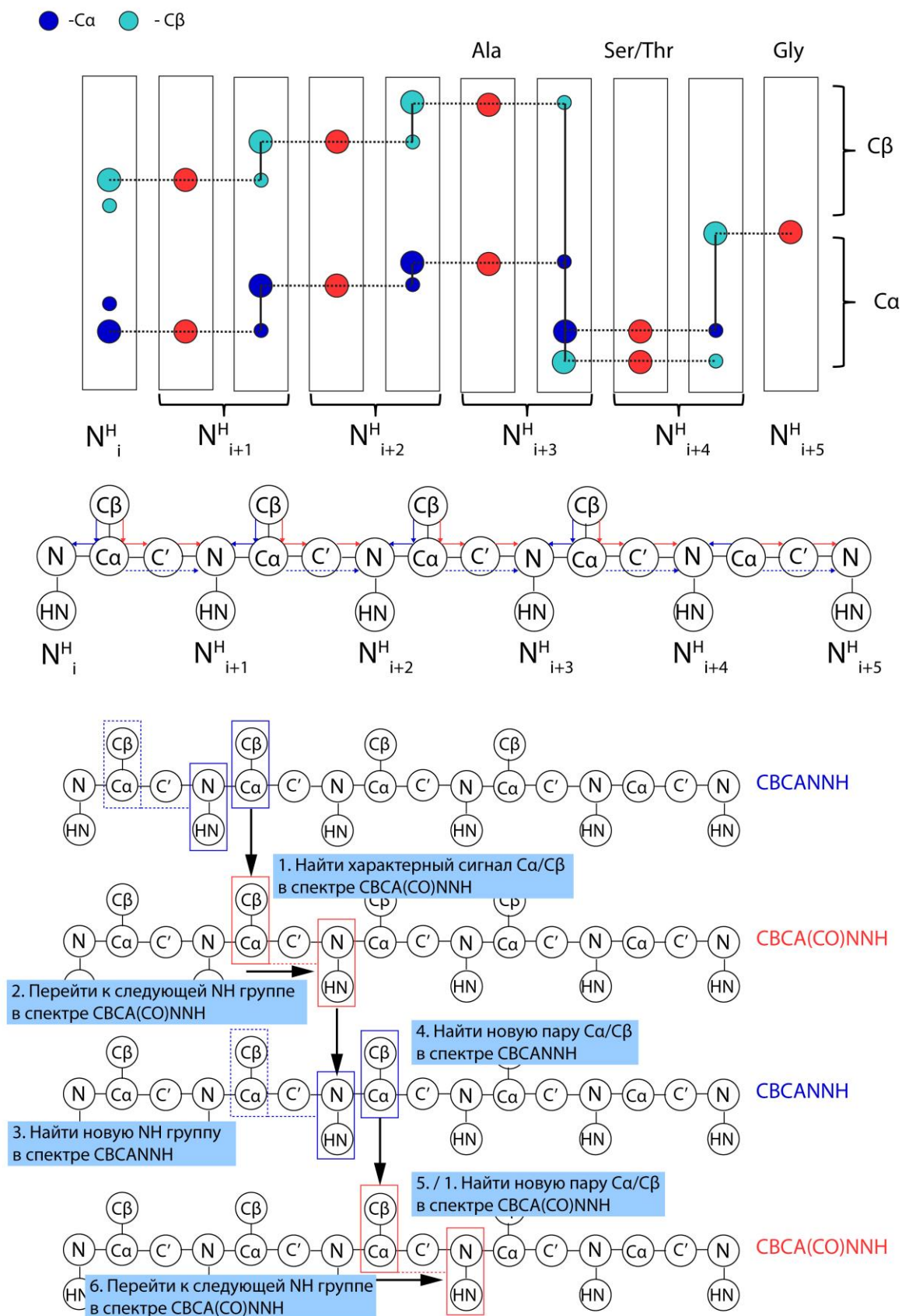


Рис. 6. Отнесение сигналов ядер ^1H и ^{13}C основной и боковых цепей белка на основе экспериментов CBCANH и CBACA(CO)NH

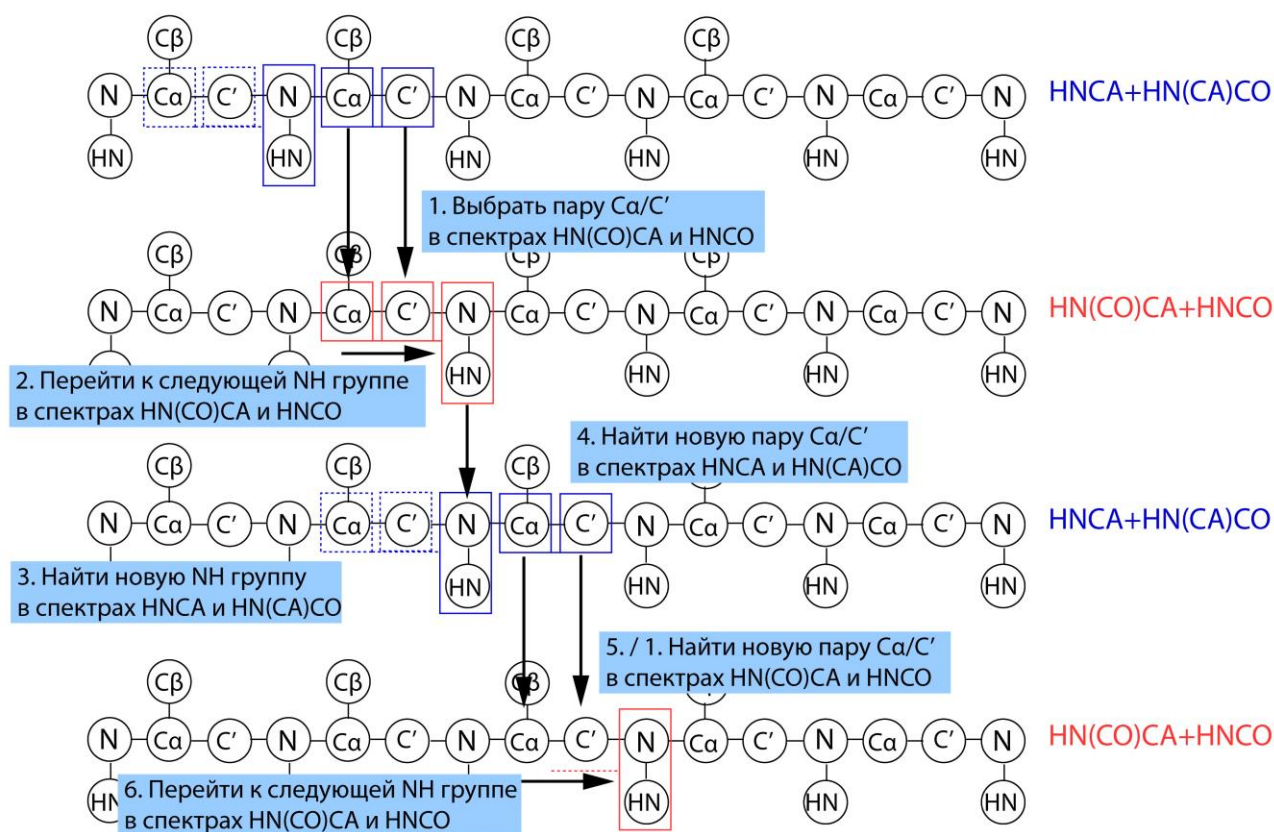


Рис. 7. Отнесение сигналов ядер 1H и ^{13}C основной и боковых цепей белка на основе экспериментов $HNCA$, $HN(CA)CO$, $HNCO$ и $HN(CO)CA$

За счет того, что структура и химический состав аминокислотных остатков различны, это приводит к отличиям в химических сдвигах ядер атомов их функциональных групп. Наиболее характерными являются сигналы $C_\alpha H$ глицина, $C_\beta H$ трионина и серина (рис. 8, рис. 9).

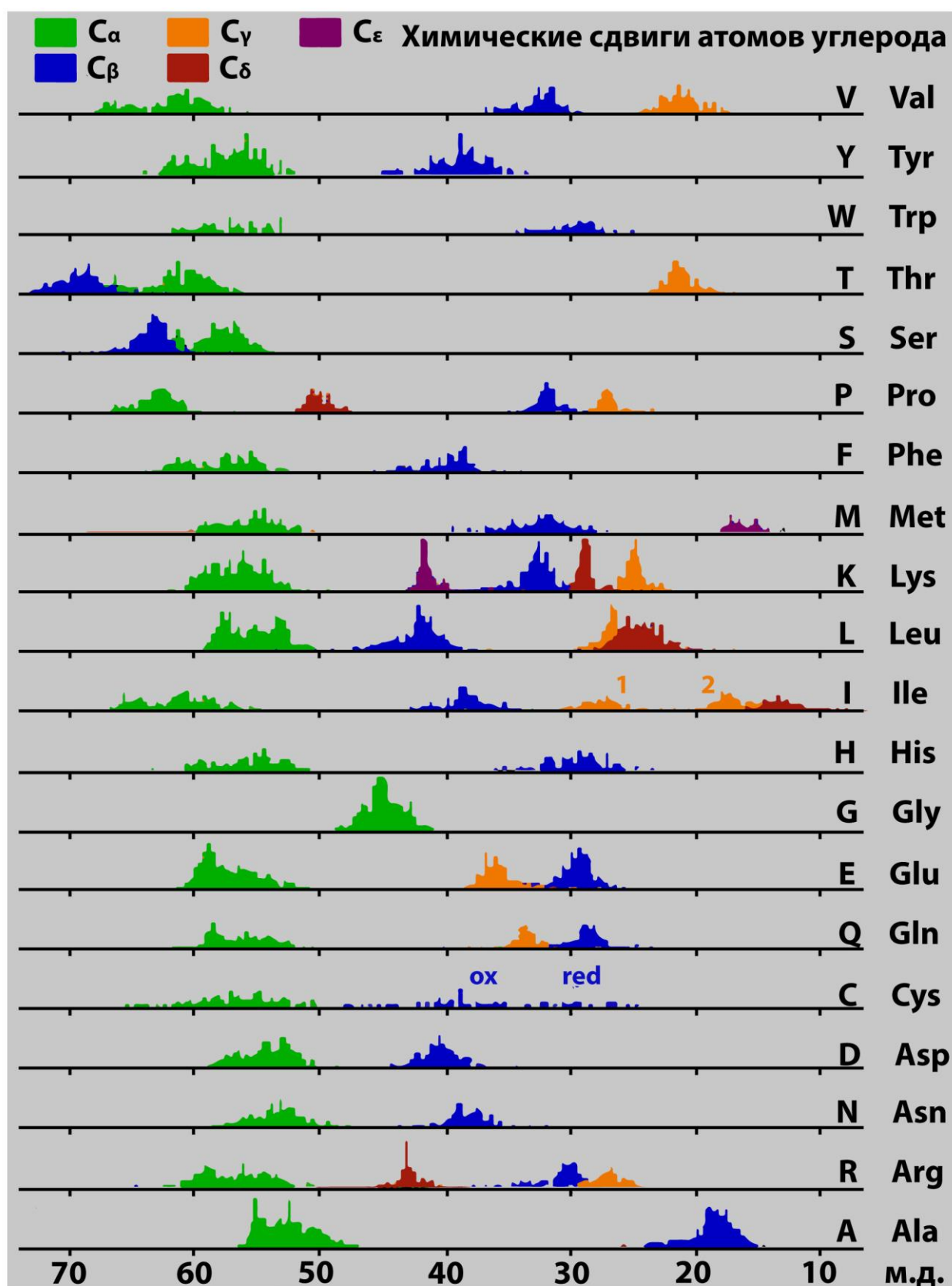


Рис. 8. Химические сдвиги ^{13}C основной и боковых цепей белка

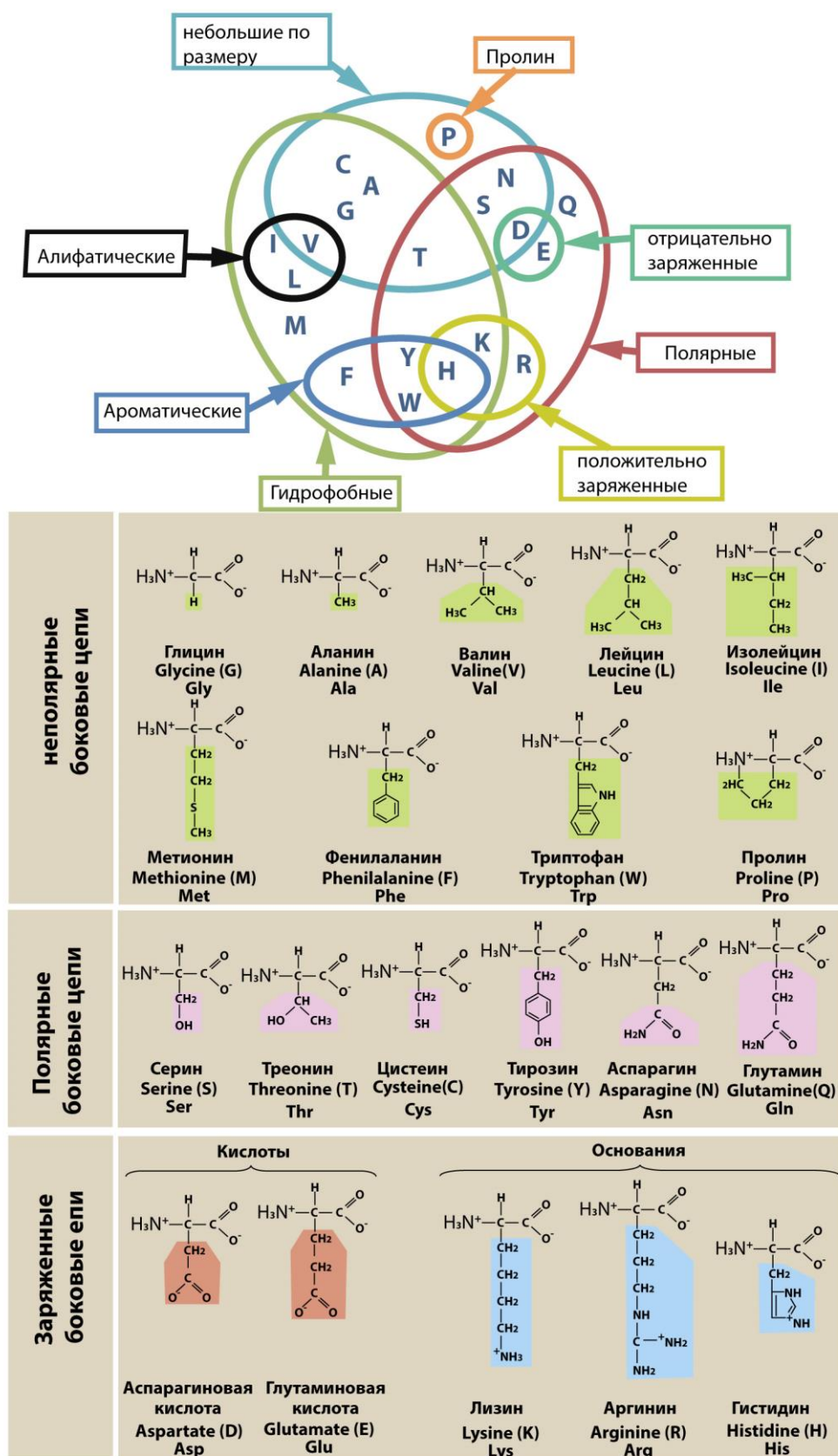
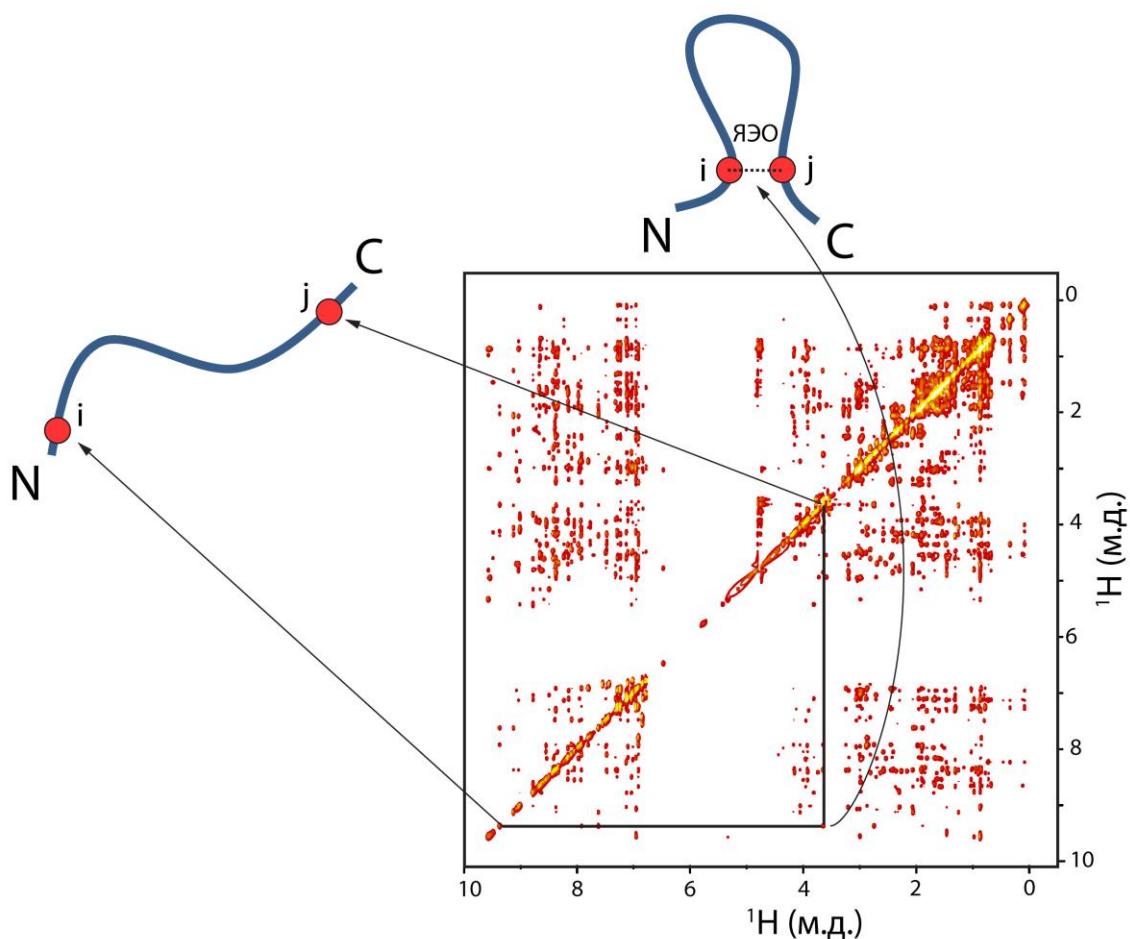


Рис. 9. Структура основных аминокислот



интенсивность сигнала ~ ЯЭО между протонами i и $j \sim 1/r_{ij}^6$

Рис. 10. ^1H - ^1H NOESY спектр и ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО)

После того, как все сигналы отнесены к соответствующим магнитным ядрам, возможно предсказание вторичной структуры белка на основе химических сдвигов, так как их величина зависит от расположения соседних атомов основной цепи белка и связана с величиной диэдральных углов между атомами.

Следующим этапом по установлению структуры являются эксперименты по ядерному эффекту Оверхаузера (ЯЭО), которые позволяют определять взаимодействующие через пространство магнитные ядра из различных частей молекулы, отстоящие друг от друга на расстояние до 5 Å (Рис. 10). На основе полученных значений расстояний, констант и диэдральных углов производится дальнейший расчет структуры молекулы методами молекулярной динамики.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

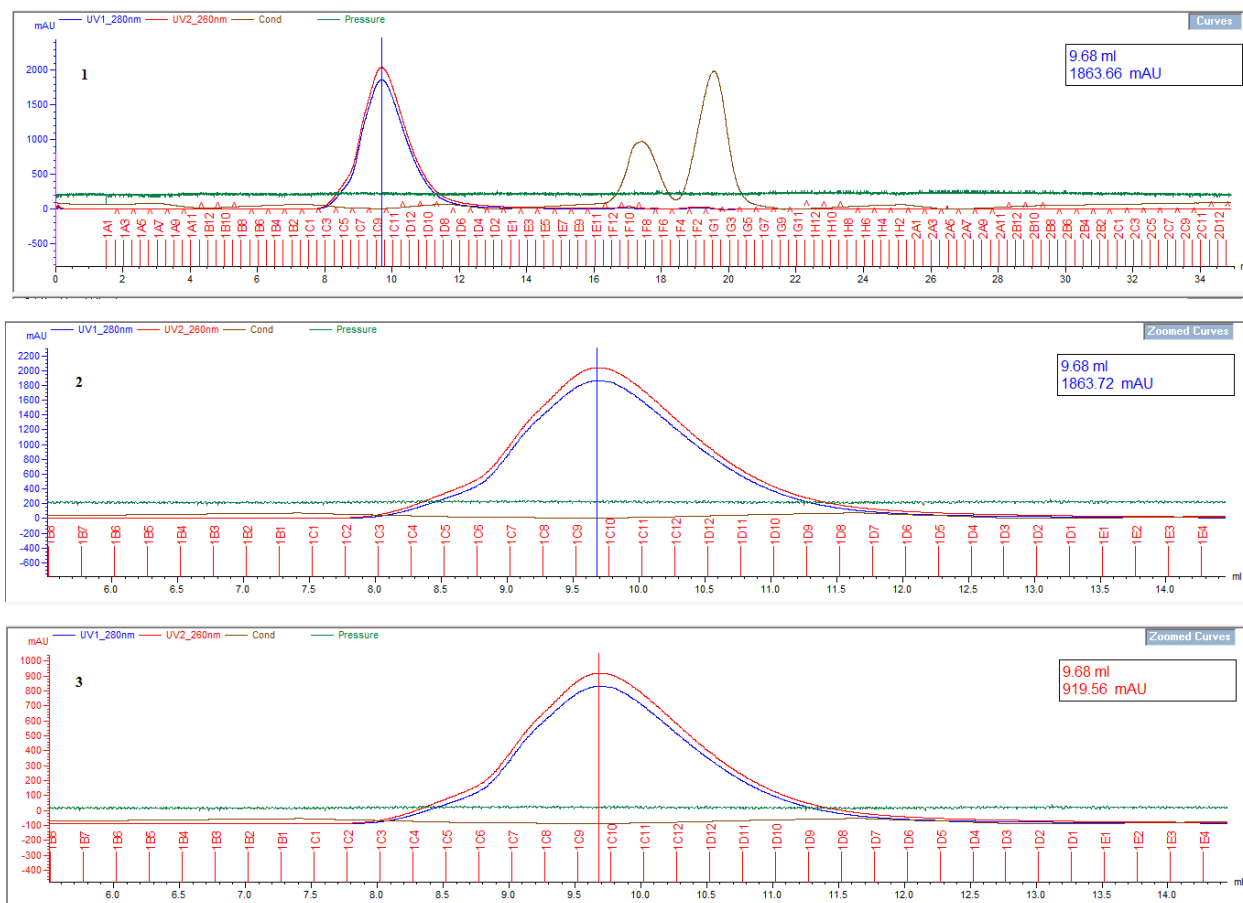


Рис. 1. Профиль гель-фильтрации

Описание профиля:

Рисунок 1.1. Показан весь профиль гель-фильтрации. Первый почти симметричный пик – выход белка из гель-фильтрационной колонки. Два следующих пика – выход имидазола (остатки после растворения осажденного белка) и соли (вносимый на колонку белок был растворен в буфере с концентрацией соли 500 mM NH_4Cl). Наверху показаны 4 параметра, представленные на рисунке профиля: синяя линия – поглощение при длине волны 280 нм, красная линия – поглощение при 260 нм, коричневая линия – показатель электропроводности раствора, индикатор, хорошо

отображающий изменение концентрации соли и других электропроводящих компонентов буфера, зеленая линия – давление в хроматографической системе во время гель-фильтрации. Справа – количественный показатель параметров, в конкретном случае – поглощения при длине волны 280 нм. Снизу – номера фракций гель-фильтрации в 96 луночном планшете, в самом низу – количество буфера в мл, пройденного через колонку. Вертикальная черта на графике, в данном случае синяя, отображает (справа в прямоугольном окне) конкретный численный показатель одного из параметров на данном шаге (мл) хроматографии.

Рисунок 1.2. Показана более подробно часть профиля, где отображается пик, характеризующий выходящий из колонки образец. Справа отображены количественные показатели поглощения при 280 нм, при данной длине волны поглощают в основном белки.

Рисунок 1.3. подобен рисунку 1.2. Справа отображены количественные показатели поглощения при 260 нм, при данной длине волны поглощают в основном ДНК и РНК (НК).

Соотношение $A_{260\text{ нм}}/A_{280\text{ нм}}$ для образца 1С9 = $919,56/1863,72 = 0,49$, что характеризует данную фракцию как белковую и без примеси НК.

Для разрешающей части полиакриламидного геля была выбрана концентрация 13,5 %, так как при данной концентрации происходит лучшее разделение линий в области исследуемого белка (белок – 22,2 кДа, маркер – 28 кДа). Аликвоты из фракций гель-фильтрации наносились в большом количестве для оценки содержания примеси. Как показано на рисунке геля, исследуемые фракции белка содержат незначительные количества примесей других белков.

Таблица 1.

Соотношения $A_{260\text{нм}}/A_{280\text{нм}}$ характеризующие
% соотношение образцов аминокислотной и нуклеиновой
природы [6-8].

$A_{260\text{нм}}/A_{280\text{нм}}$	% Белка	% Нуклеиновых кислот
0,57	100	0
1,06	95	5
1,32	90	10
1,73	70	30
1,94	30	70
1,98	10	90
1,99	5	95
2,00	0	100

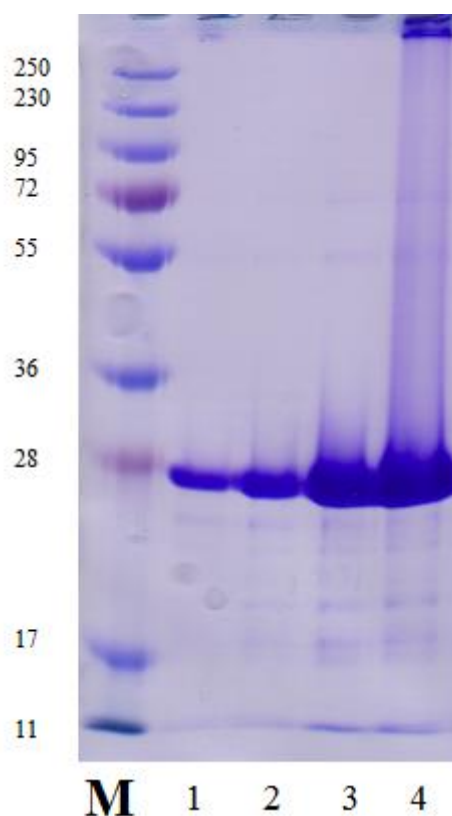


Рис. 2. Электрофоретический анализ фракций выделения и очистки белка SaHPF в полиакриламидном геле (4,5/13,5)

По X: М – маркер; количества общего белка нанесенного на лунку: 1- 0.8 мкг, 2 – 1.6 мкг, 3 – 4.1 мкг, 4 – 8.3 мкг. По Y: молекулярные массы белков в маркере.

Приложение 2

Оборудование:

1. Фильтр для фильтрации буферов – Mixed Cellulose Esters Membrane, filter type: 0.22 μ m GSWP (Merck, GSWP04700)
2. Фильтр для фильтрации образца перед нанесением на гель-фильтрацию – Centrifugal Filter Units, filter type: 0.22 μ m GV Durapore (Merck, UFC30GV0S)
3. Центрифуги: BECKMAN COULTER, Multifuge 3 L-R Heraeus, BECKMAN Avanti J-25, BECKMAN COULTER Optima LE-80K Ultracentrifuge, BECKMAN COULTER Microfuge R
4. Роторы для центрифуг: JLA 8.100, УА 25.50, Ti 50.2
5. Оборудования для разрушения клеток под давлением - Constant Cell Disruption System
6. Хроматографическая система - АКТА purifier
7. Колонка пустая, 20 мл, BIO-RAD
8. Колонке Superdex 75 10/300 (GE Healthcare)
9. Шейкер – Shaker&Rotisserie LABQUAKE
10. NanoDrop 2000/2000с, Thermo scientific
11. Магнитная мешалка – Fisherbrand
12. pH метр – Lab 850, SCHOTT instruments
13. Весы Mettler Toledo – обычные – PB5001
14. Весы Mettler Toledo – аналитические – XA105 DualRange
15. Инкубатор для роста клеток: Infors AG CH-4103
16. Спектрофотометр для оценки плотности клеточной культуры – Eppendorf BioPhotometer 8,5 mm

Химические реактивы:

1. LB AGAR – 500 г, Invitrogen, lot: 00103151, ref 22700-025
2. Ampicillin – 1 г, EUROMEDEX, ref EU0400-A
3. IPTG – 1 г, EUROMEDEX, ref EU0008-A
4. Complete Protease Inhibitor EDTA-free – 20 таблеток, Roche, ref 11 873 580 001
5. DNase RNase-Free – Promega, cat. #32 17 06 01
6. PMSF
7. Trizma Base – 1 кг, Sigma, T1503, batch#070M5454
8. Ammonium Chloride (NH_4Cl) – 1 кг, Sigma, A4514, lot#SLBJ9378V
9. Imidazole – 500 г, Sigma, I2399, lot#SLBD6304V
10. $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 250 г, Fluka Analytical, 63068, lot#BCBM3382V
11. Ammonium Sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) – 1 кг, EUROMEDEX, ref 2019, lot#230911
12. Glucose (D+Glucose anhydrous) – 1 кг, Euromedex, ref UG3050
13. Смола Ni-NTA Superflow (QIAGEN), 25 мл
14. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 1 кг, Sigma-Aldrich, 71650
15. KH_2PO_4 – 1 кг AnalaR Normapur, 26936.293
16. NaCl – 1 кг, Carlo Erba, 479687
17. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ – 10 г, Cambridge Isotope Laboratories, I-15798H
18. NaOH – 1 кг, Sigma-Aldrich, SZE93150
19. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka Chemika, 350629/1 20497, 250 г)
20. $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 100 г, Sigma, 53H0619
21. $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 250 г, Prolabo, R.P. Normapur, 23 093.233
22. $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 100 г, Sigma, 88H3445
23. H_3BO_3 – 1 кг, Euromedex, 50765
24. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 100 г, MERCK, A761363
25. Glucose- ^{13}C – 5 г, EURISO-TOP, 110187-42-3
26. CaCl_2 – 0,5 кг, MERCK, A546282
27. Thiamine – 25 г, Sigma, 49H0392
28. D-biotine – 5 г, Alfa Aesar, A14207
29. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 1 кг, MERCK, 25746916

30. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 1 кг, Carlo ERBA, 10039324

31. NaN_3 – 250 г, MERCK, 6688

Стоковые растворы:

- 100 мг/мл Ampicillin (1 мл) (хранить при -20°C)
 - ✓ Ampicillin (EUROMEDEX 1g – EU0400-A) – 0,1 г – доводим до 1 мл mQ
- 1M IPTG (хранить при -20°C)
 - ✓ IPTG (EUROMEDEX 1 г – EU0008-A) – 1 г – доводим до 4,2 мл mQ
- 1M Tris-HCl pH 7,6 (500 мл) (хранить при 4°C)
 - ✓ Trizma Base (Sigma T1503) – 60,57 г
 - ✓ HCl (37%) – доводим pH до 7,6
- 4M NH_4Cl (1000 мл) (хранить при 4°C)
 - ✓ Ammonium Chloride (Sigma A4514) – 213,96 г
- Complete Protease Inhibitor EDTA-free (Roche Cat. #11 873 580 001) – 1 таблетка на 25 г клеток (хранить при -20°C)
 - ✓ Растворен в mQ: 1 таблетка на 2 мл mQ – 80 мкл на 1 г клеток.
- PMSF as Complete Protease Inhibitor (хранить при -20°C)
 - ✓ Растворен в ацетоне: 30 мг в 0,30 мл ацетоне – 12 мкл на 1 г клеток.
- 2M Imidazole (500 мл)
 - ✓ Imidazole (Sigma I2399) – 68,08 г

➤ Phosphate buffer pH 6,8

✓ NaH_2PO_4 1M: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MERCK, 25746916) –

100 мл = 13,79 г + mQ

✓ Na_2HPO_4 1M: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Carlo ERBA, 10039324) –

100 мл = 35,81 г + mQ

✓ Phosphate buffer pH 6,8 100 мл = 51 мл 1M NaH_2PO_4 + 49 мл
1M Na_2HPO_4

➤ 10% Sodium azide NaN_3 (0,1 мл)

✓ Sodium azide (MERCK, 6688) – 10 мг

ЛИТЕРАТУРА

1. Аюпов, Р.Х. Выделение и очистка белка [Текст]: Учебно-методическое пособие / Р.Х. Аюпов, М.М. Юсупов. – Казань: Казан. ун-т, 2015. – 19 с.
2. Bystrov, V.F. Refinement of the angular dependence of the peptide vicinal NH-CaH coupling constant [Text] / V.F. Bystrov, V.T. Ivanov, S.L. Portnova, T.A. Balashova, Yu.A. Ovchinnikov // Tetrahedron. – 1973. – Vol.29, N6. – P.873–877.
3. Nagayama, K. Experimental-Techniques of Two-Dimensional Correlated Spectroscopy [Text] / K. Nagayama, A. Kumar, K. Wuthrich, R. R. Ernst // Journal of Magnetic Resonance. – 1980. – Vol.40, N2. – P.321-334.
4. Ernst, R. R. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions [Text] / R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun. – Oxford: Oxford University Press, 1990. – 610 p.
5. Bax, A. An Improved Method for Heteronuclear Chemical-Shift Correlation by Two-Dimensional NMR [Text] / A. Bax, G. A. Morris // Journal of Magnetic Resonance. – 1981. – V.42, N3. – P.501-505.
6. Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Text] / J. Sambrook, D.W. Russell. –New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. – 2344 p.
7. Warburg, O. Isolation and crystallization of enolase / O. Warburg, W. Christian // Biochemische Zeitschrift. – 1942 . – Vol.310. – P.384-421.
8. Sambrook and Russell cites the original paper: Warburg, O. and Christian W. (1942). “Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase”. Biochem. Z. 310: 384–421.
9. Glasel, J. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios [Text] / J. Glasel // BioTechniques. – 1995. – Vol.18, N1. – P. 62–63.